

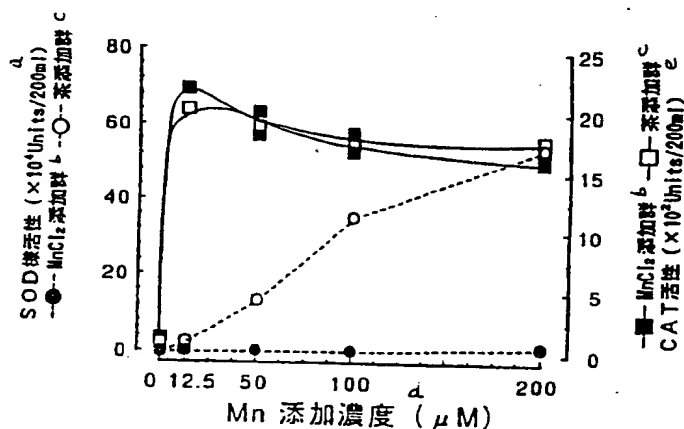


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A23L 3/3472, 3/3571, A23C 9/12, 9/137, A23F 3/30		A1	(11) 国際公開番号 WO 94/26133
		(43) 国際公開日 1994年11月24日(24.11.94)	
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP94/00753 1994年5月9日(09. 05. 94)		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平5/109643 1993年5月11日(11. 05. 93) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 戸羽正道(TOBA, Masamichi)(JP/JP) 〒841 佐賀県鳥栖市村田町二本松3-1-A-2 Saga, (JP) 内山成人(UCHIYAMA, Shigeto)(JP/JP) 〒841-02 佐賀県三養基郡基山町宮浦辻1157-1 Saga, (JP) 太田玲子(OHTA, Reiko)(JP/JP) 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町786-1-303 Saga, (JP) 清水精一(SHIMIZU, Seiichi)(JP/JP) 〒841 佐賀県鳥栖市元町1237-2-1001 Saga, (JP) 坂本修一(SAKAMOTO, Shuichi)(JP/JP) 〒830 福岡県久留米市隈野町2352-7-304 Fukuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 亀井弘勝, 外(KAMEI, Hirokatsu et al.) 〒542 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目2番3号 第3松屋ビル 4F あい特許事務所内 Osaka, (JP)			

(54) Title : ANTIOXIDANT FOOD, ANTIOXIDANT PREPARATION AND ANTIOXIDIZATION METHOD

(54) 発明の名称 抗酸化食品、抗酸化製剤および抗酸化方法



- a ... SOD-like activity (10⁴ UNITS/200ml)
 b ... MnCl₂-containing group
 c ... tea-containing group
 d ... concentration of Mn added (μM)
 e ... catalase activity (10³ UNITS/200ml)

(57) Abstract

An antioxidant food comprising a product of fermentation of a food containing a manganese-containing natural material, such as tea leaves, by using a microbe having a catalase activity, such as *Lactobacillus plantarum*. It has both a superoxide dismutase-like activity and a catalase activity and hence exhibits an antioxidant activity in the body of a living organism, including the digestive tract. Therefore it is efficacious in preventing diseases caused by active oxygen.

(57) 要約

本発明の抗酸化食品は、茶葉などのマンガ含有天然素材を加えて、カタラーゼ活性を有する菌（例えばラクトバチラス・プランタラム）で醗酵させた醗酵製品であって、スーパーオキシドジスムターゼ様活性とカタラーゼ活性とを同時に発現することにより、消化管内を含む生体内での抗酸化作用を有し、活性酸素に起因する疾患の予防に有効である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェッコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	VN	ベトナム
CS	チェコスロヴァキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー		

明細書

抗酸化食品、抗酸化製剤および抗酸化方法

<技術分野>

5 本発明は、スーパーオキシド (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) を除去することにより、活性酸素に起因する疾患の予防、改善を目的とした抗酸化食品、抗酸化製剤および抗酸化方法に関する。

<背景技術>

メチニコフの長寿説以来、乳酸菌あるいは乳酸菌を用いた食品の生理効果に関して多くの研究がなされている。

10 ヨーグルトなどの酸酵乳に含まれる乳酸菌の機能としては、腸内菌叢改善効果、整腸作用などがよく知られており、さらに近年では免疫賦活作用、抗菌作用、抗腫瘍作用などの機能を持つことが報告されている。このように、乳酸菌には種々の保健効果が期待できることから、特にヒトの腸内からも検出されるラクトバチラス・アシドフィラス、ラクトバチラス・カゼイ、ビフィドバクテリウム属を中心

15 ところにこれらの菌種を用いた酸酵乳や乳酸菌飲料が市販されている。
ところで、活性酸素は白血球の殺菌作用など生体防御因子として重要であるが、生体内での過剰な生産は様々な組織障害をひき起こすことが明らかにされている。

20 活性酸素を発生させる日常的な要因としては、ストレス、アルコール、過酸化物、薬物、運動などが知られている。これらの要因によって発生した活性酸素や過酸化脂質は、脳神経疾患、循環器疾患、癌、消化器疾患、肝疾患、動脈硬化、腎疾患、糖尿病、老化などと密接に関係していることが指摘されている。

25 生体はこのような酸素毒性から身を守るために一連の酸化防御システムを保持しているが、一方でこれらのシステムを正常に機能させるためには十分に抗酸化栄養成分を摂取することが重要とされている。天然の抗酸化栄養成分としては、ビタミンE、ビタミンC、 β -カロテン、ポリフェノール、さらにセレン、銅、亜鉛などの微量元素が知られており、抗酸化を目的として、これらの栄養成分を含有した食品の研究開発も行われている。

生体内の抗酸化機構は、その作用により、予防的抗酸化作用（ラジカルの発生

を抑制)と、連鎖切断型抗酸化作用(すでに生じたラジカルの捕捉と消去)とに大別される。前者の作用を有するものにはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)などの酵素類が、後者の作用を有するものには前述の抗酸化栄養成分がそれぞれあけられる。

しかしながら、従来の抗酸化食品では、脂質過酸化のイニシエーションに關与するスーパーオキシド(O_2^-)および過酸化水素(H_2O_2)の連鎖的除去を目的とする製品は知られていない。

本発明の目的は、スーパーオキシドジスムターゼ(以下、SODという)様活性とカタラーゼ(以下、CATという)活性とを同時に発現する、とくに予防的抗酸化作用にすぐれた抗酸化食品、抗酸化製剤および抗酸化方法を提供することである。

<発明の開示>

本発明の抗酸化食品は、消化管内を含む生体内での抗酸化作用を有するものであって、マンガン含有天然素材を加えて、CAT活性を有する菌で醗酵させた醗酵製品からなる。

すなわち、本発明は、種々の乳酸菌のうちで特定の菌はマンガンの存在しない生育環境下ではCAT活性を発現しないが、マンガンが存在すると、マンガンを菌体内に取り込むことでMn-CAT活性を発現すると共に、SOD様活性をも同時に発現するという知見を得て、完成されたものである。かかる本発明の抗酸化食品は、とくに予防的抗酸化食品として好適である。

前記Mn-CATは、鉄を含有するheme-CATに比較して多くの阻害剤、修飾剤、種々のキレート剤などに影響されず、広い範囲のpHや温度に対しても安定性を示すことが知られている。

また、本発明の抗酸化食品は、上記のような醗酵製品のほか、CAT活性を有する菌体と、マンガン含有天然素材とを含有する乾燥品、好ましくは凍結乾燥品であってもよい。

さらに、本発明は、CAT活性を有する菌体と、マンガン含有天然素材とからなる抗酸化製剤をも提供するものである。この抗酸化製剤は乾燥品(錠剤、粉末

、顆粒、カプセルなどの形態)であってもよく、あるいは溶液の形態であってもよい。

- 5 また、本発明によれば、マンガン含有天然素材を加えてCAT活性を有する菌で醗酵させた醗酵製品を生体内に摂取して、SOD様活性とCAT活性とを同時に発現させることを特徴とする、消化管内を含む生体内での抗酸化方法も提供される。

<図面の簡単な説明>

図1はMnCl₂添加または茶添加によるSOD様活性およびCAT活性の変化を示すグラフ、

- 10 図2は幽門結紮ラットにおけるラクトバチラス・プランタラム醗酵物投与後のSOD様活性の経時変化を示すグラフ、

図3は幽門結紮ラットにおけるラクトバチラス・プランタラム醗酵物投与後のCAT活性の経時変化を示すグラフ、

図4は幽門結紮胃における生菌数の変動を示すグラフ、

- 15 図5は茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物の醗酵前後におけるSOD様活性を示すグラフ、

図6はインドメタシン胃潰瘍モデルにおける茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物投与後の効果を示すグラフ、

- 20 図7は茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物投与後の血清中SOD(様)活性を示すグラフ、

図8は過酸化水素誘発性胃粘膜障害に及ぼす茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物投与後の効果を示すグラフ、

図9は茶抽出液およびMnCl₂のMPO活性阻害効果を示すグラフ、

図10はカテキンのMPO活性阻害効果を示すグラフである。

- 25 <発明を実施するための最良の形態>

本発明におけるMn-CAT活性を有する菌としては、例えば乳酸桿菌であるラクトバチラス・プランタラム(Lactobacillus plantarum [ATCC14431株])があげられる。

細菌の分類学上、乳酸菌はCAT活性を持たないとされている。しかしながら

、前記したラクトバチラス・プランタラムは生育環境内にマンガンが存在すると、マンガンを含む菌体内に取り込んで、Mn-CAT活性を発現する。一方、マンガンはSODの中心金属としての役割をなすと共に、マンガンそのものもSOD様活性を有することが知られている。従って、ラクトバチラス・プランタラムにて

5 マンガン含有天然素材の存在下で醗酵させることにより、SOD様活性とCAT活性とを併せ持つ醗酵製品の製造が可能になる。

ところで、近時、リウマチや心臓虚血症などに対するSODの臨床応用が進められているが、SOD単独使用では過酸化水素の局所量を増加させる結果となり、二次的に最もラジカル反応性の高いヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)を生成することが問題視されている。従って、SODを作用させる際には、CATやGSH-Pxを併用することで O_2^- の消去と同時に過酸化水素を除去することが重要である。よって、ラクトバチラス・プランタラムにMnを添加することによって得られるSOD様とCATとの連関作用は上記の理由からも非常に重要であると

10 考えられる。

また、ラクトバチラス・プランタラム以外にも、CAT活性を有する菌を使用する限りは、たとえSODを産出しなくても、マンガンそのものがSOD様活性を有することから、ラクトバチラス・プランタラムと同様な効果があると考えられる。ラクトバチラス・プランタラム以外のMn-CAT活性を有する菌としては、例えばペディオコッカス・ペントサセウス(*Pediococcus pentosaceus*)、ペディオコッカス・アシディラクティシ(*P. acidilactici*)、サーモレフィルム・アルブム(*Thermoleophilum album*)などがあげられる。

15

20

また、本発明の抗酸化食品または抗酸化製剤は、上記のような醗酵製品のほか、カタラーゼ活性を有する菌体と、マンガン含有天然素材とを含有する乾燥品、好ましくは凍結乾燥品であってもよい。かかる乾燥品は粉末、顆粒、錠剤などの

25

任意の形態で用いられる。この乾燥品はそのまま摂取してもよく、あるいは家庭などにおいて市販牛乳に添加し醗酵させてヨーグルドを作製し摂取してもよい。さらに、乾燥品のほか、冷凍品などの形態であってもよい。

本発明における前記マンガン含有天然素材は、菌体にマンガンを供給するためのものである。天然素材としたのは、マンガンはそれ自体では食品添加物として

5 認可されたものが存在しないことから、無機化合物として添加することは不可能だからである。マンガンを多く含有する天然素材としては、茶葉やキャベツ、ホウレンソウに代表される野菜類、ハーブ類など植物全般に多く含まれている。従って、これらの植物の添加は、CAT活性を有する菌に対してCAT活性およびSOD様活性の発現に必要なマンガンを供給するうえで重要であるが、とくに茶葉はそれ自体がカテキン、ビタミンC、各種微量元素などの抗酸化成分を多く含有することから、高い添加効果が得られる。

10 とくに前記ラクトバチラス・プランタラムに対する茶葉の添加がSOD様活性およびCAT活性を発現させるだけに留まらず、無機のMn化合物（例えば塩化マンガン $MnCl_2$ など）と比較して、はるかに高いSOD様活性を示し、また胃液暴露下でのSOD様活性およびCAT活性を長時間維持することができるという効果がある。

15 茶葉やその他の天然素材は、粉末の形態で添加するのが、菌によるマンガンの取込みが容易になるので好ましい。粉末化は、天然素材を水および/ または水混和性有機溶媒（例えばエチルアルコールなどのアルコール類）で抽出し、ついで水に対して非混和性の有機溶媒（例えばクロロホルム、酢酸エチル、ブタノールなど）で抽出し、有機相と水相とに分けて、水相から溶解固形分を回収し乾燥することによって行われる。また、水および/ または水混和性有機溶媒で抽出した溶液から固形分を回収し、粉末化したものであってもよい。さらに、粉末化せず
20 に、天然素材を水で抽出した水溶液をそのまま添加してもよく、あるいは天然素材を細かく粉砕したものをそのまま添加してもよい。

前記茶葉としては、例えば玉露、玉露茶、抹茶、煎茶、番茶、粉茶、芽茶、ほうじ茶などの緑茶（不發酵茶）、紅茶などの發酵茶、ウーロン茶、パオチョン茶（ジャスミン茶）などの半發酵茶などがあげられる。

25 マンガン含有天然素材の添加量は、發酵製品の場合で製品1kgに対してマンガンを換算で4～20mg程度、好ましくは4～8mg程度であるのがよい。また、主に菌体とマンガン含有天然素材と賦形剤とからなる乾燥品の場合には、マンガンを換算で4～20mg程度、好ましくは4～8mg程度であるのがよい。

本発明の抗酸化食品の形態としては、前述のように醗酵製品および（凍結）乾燥品が代表例としてあげられる。

5 本発明における醗酵製品には、ヨーグルトなどの醗酵乳と、乳酸菌飲料とが含まれる。醗酵乳は、牛乳または脱脂乳１リットルに対して、マンガン含有天然素材の所定量を加え、CAT活性を有する乳酸菌を接種し、35～37℃で12～72時間程度醗酵させることによって得られる。乳酸菌スターター、マンガン含有天然素材の添加量、醗酵時間などを調整することにより、固形（静置ヨーグルト）、半固形（攪拌ヨーグルト）および液状（ドリンクヨーグルト）のヨーグルト形態が製造できる。また、醗酵乳に適宜甘味料（ブドウ糖、ショ糖など）や果肉（グレープフルーツ、リンゴ、オレンジ、レモンなど）、ミネラル源としての無機電解質（塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなど）、ビタミン類、香味料などを適宜加えてもよい。

10

また、乳酸菌飲料は、脱脂乳、糖（例えばブドウ糖、ショ糖）などの混合液にマンガン含有天然素材の所定量を加え、CAT活性を有する乳酸菌を接種し、35～37℃で12～72時間程度醗酵させることによって得られる。脱脂乳と水、果汁などの希釈液との割合で、液状ヨーグルトタイプやジュースタイプなどが製造できる。醗酵ベースとしては、前記脱脂乳のほか、乳清、低脂肪乳なども使用可能である。希釈液としては、前記水のほか、果肉、ラクトコーヒーなどがあげられる。

15

20 本発明における乾燥品は、 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{10}$ 相当の菌体と、2～4gのマンガン含有天然素材を混合し、賦形剤を加えて乾燥したものである。賦形剤としては、例えば乳糖、ブドウ糖、ショ糖、オリゴ糖などがあげられる。

本発明における乾燥品は、そのまま摂取してもよく、あるいは一般家庭などにおいて牛乳に添加し、室温で12～24時間醗酵させてヨーグルトを作製し摂取してもよい。

25

<産業上の利用可能性>

以上のように本発明の抗酸化食品または抗酸化製剤は、SOD様活性とCAT活性とを同時に発現し、スーパーオキシドおよび過酸化水素を除去することができるので、活性酸素に起因する疾患の予防に有効である。

<実施例>

試験例 1

(in vitroにおける茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物のSOD様活性およびCAT活性について)

- 5 ラクトバチラス・プランタラムをAPT液体培地（バクトトリプトン、酵母抽出物、グルコース、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウムおよび炭酸ナトリウムを含む）で培養（醗酵）させる際、MnCl₂ または茶葉（粉末化緑茶）を、Mn換算で12.5 μM、50 μM、100 μMおよび200 μMの濃度となるように培地に添加し、16時間培養後
10 （菌の増殖が最大に達した時点）の菌体およびMnCl₂ または茶葉を含む培地全体のSOD様活性およびCAT活性を検討した。

SOD様活性はNBT還元法にて、CAT活性は過酸化水素の減少速度より求めた。その結果を図1に示す。

- 15 図1に示すように、SOD様活性はMnCl₂ および茶葉のいずれの場合もMn添加量に比例して増加したが、SOD様活性の絶対値は茶葉添加時のほうがはるかに高かった（Mnの200 μM添加時で約35倍）。

CAT活性については、Mnを添加しない場合は検出限界以下であった。一方、12.5 μM以上のMnを添加することにより、MnCl₂ および茶葉のいずれも1800 U/200 ml APT培地前後の活性を発現した。

- 20 ところで、O₂⁻ やH₂O₂ の除去におけるSODやCATの役割は明白であるが、これらは酵素であるため、食品などとして経口摂取しても失活して効果はないとされている。しかし、Mn添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物の場合、SOD様活性およびCAT活性は菌体内に保持されていることから、菌が死滅しない限り、これらの活性も保持されていることが期待される。また、前述の
25 ように、Mnそのものや茶葉中の成分はSOD様活性をもつが、酵素でないことから失活しにくいと考えられる。

以上を実証するために、次の試験例において、幽門結紮ラットを用い、茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物を強制的に経口投与し、投与後のSOD様活性およびCAT活性の経時変化を調べた。

試験例 2

(幽門結紮ラットを用いた、胃内におけるラクトバチラス・プランタラム醗酵物のSOD様活性およびCAT活性の保持について)

5 SD系雄性ラット(体重250g)を幽門結紮後、直ちにラクトバチラス・プランタラム醗酵物5mlを経口ゾンデにて投与し、経時的に胃内容物を回収し、SOD様活性およびCAT活性の変動を検討した。その結果を図2および図3に示す。なお、被験物はAPT液体培地にMnCl₂または茶葉(粉末化緑茶)をい

10 ずれもMnとして50μMの濃度で添加し、ラクトバチラス・プランタラム接種後、16時間醗酵させたものである。

図2に示すように、SOD様活性は、MnCl₂添加の場合、30分で約35%まで低下し、60分までに消失した。これに対して、茶添加の場合は3時間まで高い活性を保持したままであった。

15 図3に示すように、CAT活性はMnCl₂添加の場合、初期値に対して30分で約80%まで低下し、SOD様活性と同様に60分までに消失した。一方、茶添加群では30分でむしろ20%程度上昇し、60分で初期値と同等の活性を発現し、3時間でもわずか(15%程度)に活性を維持した。

また、経口投与した後の生菌数は、図4に示すように、MnCl₂添加の場合、60分で約1000分の1まで低下し、3時間後には検出されなかった。一方、茶添加群では、60分まで投与前値の生菌数を保持していたが3時間後には検

20 出されなかった。なお、図4において、「ND」とは検出限界(10⁴)以下であることを示している。

このように、ラクトバチラス・プランタラムへの茶添加は、単にSOD様活性やCAT活性が発現するばかりでなく、MnCl₂などの無機化合物に含まれるMnと比較して、長時間にわたり高い活性を維持することが明らかになった。こ

25 れは、胃内での生菌数の維持に起因するものと考えられる。

試験例 3

(茶葉水溶性画分の乳酸醗酵前後のSOD様活性について)

茶添加の際に、高いSOD様活性が得られるのは、前述のとおりであるが、実際にAPT液体培地に茶葉(粉末化緑茶)をMnとして50μM添加し、常温で

24時間放置した後の水溶性画分（醱酵前の培地上澄み）のSOD様活性を測定した。その結果、図5に示すように、醱酵前のSOD様活性は54,040 U/200 ml APT培地と高かった。

5 一方、茶葉をMnとして50 μ M添加した前記茶添加APT液体培地にラクトバチラス・プランタラムを接種し、16時間醱酵させた後の水溶性画分（培地上澄み）のSOD様活性を測定した。その結果、図5に示すように、醱酵後のSOD様活性は約93,400 U/200 ml APT培地であった。

10 このことから、醱酵させることで醱酵前の約1.7倍の活性の増強が認められた。これは、茶葉がラクトバチラス・プランタラムに資化されることで、抗酸化成分がより有効な形態として存在するようになったためと考えられる。この点からもラクトバチラス・プランタラムに茶葉を添加する効果が認められる。

試験例4

（ラクトバチラス・プランタラム醱酵物の経口投与による胃粘膜障害抑制作用について）

15 (1) インドメタシン胃潰瘍モデルにおける効果

20 SD系雄性ラット（体重250 g）にインドメタシン20 mg/kgを皮下投与して6時間後の胃潰瘍形成に対するラクトバチラス・プランタラム醱酵物の効果を検討した。ラクトバチラス・プランタラム醱酵物は、APT培地に茶抽出液（緑茶100 gを熱水1リットルで抽出したもの）をMnとして50 μ M濃度となるように添加し、ラクトバチラス・プランタラム接種後16時間醱酵させたものを使用した。

被験物は、以下のとおりである。

25 (a)茶添加ラクトバチラス・プランタラム醱酵物群：茶抽出液をSOD様活性が24000ユニット/mlになるように調製してラクトバチラス・プランタラム醱酵物に添加したもの。ラクトバチラス・プランタラムの生菌数は 6.3×10^9 個/mlとした。

(c)コントロール群：APT培地のみ

被験物はインドメタシン皮下投与後、それぞれ2.5 mlずつ3時間間隔で2回経口投与した。

その結果を図6に示す。図6は、インドメタシンの皮下投与後6時間での各群の潰瘍係数 (Ulcer Index) をラット10匹での平均値±標準誤差で示したものである。同図に示すように、コントロール群における潰瘍係数は、 5.8 ± 1.8 mmであった。また、コントロール群においては、使用したラット10匹全てに潰瘍の発生を確認した。これに対して、茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物群では、コントロール群に対して優位に抑制した ($p < 0.05$)。

潰瘍係数による評価と同時に、被験物投与後の血清除蛋白成分中に存在するSOD様活性を測定した。その結果、図7に示すように、コントロール群では、除蛋白成分中のSOD様活性は 0.23 ± 0.08 ユニット/ml であった。これに対して、茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物群においては 2.34 ± 0.33 ユニット/ml と有意な増加を示した ($p < 0.01$)。

(2) 過酸化水素胃粘膜障害モデルにおける効果

過酸化水素による胃粘膜障害を作成するためにSD系雄性ラット (体重250 g) に幽門結紮術を施し、さらに組織中グルタチオンの枯渇剤としてジエチルマレイン酸 (0.75 ml/kg) を皮下投与した。7.5%過酸化水素0.5 ml を経口投与し3時間後における胃粘膜障害に対するラクトバチラス・プランタラム醗酵物の効果を検討した。

ラクトバチラス・プランタラム醗酵物は、APT培地に MnCl_2 または茶抽出液 (緑茶100 gを熱水1リットルで抽出したもの) をMnとして $50 \mu\text{M}$ 濃度となるように添加し、ラクトバチラス・プランタラム接種後16時間醗酵させたものを使用した。

被験物は、以下のとおりである。

(a) ラクトバチラス・プランタラム醗酵物群: MnCl_2 で醗酵させたもの

(b) 茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物群: 茶抽出液をSOD様活性が 2400 ユニット/ml になるように調製してラクトバチラス・プランタラム醗酵物に添加したもの。ただし、ラクトバチラス・プランタラムの生菌数は 6.3×10^9 個/ml とした。

(c) 茶群: 茶抽出液をSOD様活性が 2400 ユニット/ml になるように調製してAPT培地に添加したもの。

(d)コントロール群：A P T培地のみ

被験物はそれぞれ2.5 mlずつ過酸化水素投与直前に経口投与した。

5 その結果を図8に示す。図8はラット10匹での胃粘膜障害面積率の平均値と標準誤差とを示している。同図に示すように、コントロール群では障害面積が30.60 ± 6.34%であるのに対して、茶群およびラクトバチラス・プランタラム醗酵群では胃粘膜の障害面積がそれぞれ22.38 ± 5.59%および20.32 ± 8.05%であり、コントロール群に対して有意な差は認められなかった。一方、茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵群では、胃粘膜の障害面積が4.46 ± 2.12%とコントロール群に対して顕著な抑制効果を示した(p < 0.05)。

10 (3) 結果

15 インドメタシン胃潰瘍モデルにおいて、茶添加ラクトバチラス・プランタラム醗酵物による胃潰瘍形成の抑制効果を認めた。さらに、過酸化水素胃粘膜障害モデルでは、ラクトバチラス・プランタラム菌体および茶それぞれ単独投与での効果は認められず、それらの併用において抑制効果が認められた。

20 本来、インドメタシンによる胃潰瘍形成は、プロスタグランディン生成阻害による粘膜抵抗性低下や血流低下によるものと説明されてきたが、最近の報告によれば、アラキドン酸代謝過程および好中球侵潤による活性酸素の関与を認めている。今回用いたインドメタシンの皮下投与は、投与部位から血液を介して胃粘膜に作用するため、胃粘膜内に産生した活性酸素が関与するものと考えられる。

25 茶添加ラクトバチラス・プランタラムによって胃潰瘍形成が抑制されたことは、同時に血清中除蛋白成分のSOD様活性が増大した結果と考え合わせると、茶葉中の抗酸化物質が吸収されて胃粘膜内で活性酸素の消去を行った可能性が高い。過酸化水素の経口投与による胃粘膜障害は、過酸化水素の直接的な粘膜障害と好中球侵潤を介した間接的な障害が考えられるが、いずれにしても胃管腔内に存在する過酸化水素が誘起物質として作用している。茶とラクトバチラス・プランタラム菌体の併用投与において過酸化水素による胃粘膜障害を抑制したことは、ラクトバチラス・プランタラム菌体のMn-CAT活性が胃管腔内で有効に作用したことを意味する。一方、ラクトバチラス・プランタラム菌体の単独投与で有

意な抑制効果を示さなかったのは、胃管腔内で菌体のCAT活性が有効に作用しなかったものと推察され、試験例2の結果を反映している。

試験例5

(茶抽出物およびカテキンのMPO (ミエロパーオキシダーゼ) 活性阻害作用

5 について)

好中球は、生体内で異物や細菌を解毒化するために活性酸素を産生することは知られている。特に好中球にはMPOと呼ばれる過酸化水素の不均化系があり、それによってさらに細胞毒性の高い過塩素酸あるいはモノクロラミンを生成する。過剰反応時には、MPOの好中球外への漏出が確認されており、生体膜の障害を引き起こす一要因と考えられている。インドメタシン胃潰瘍および過酸化水素胃粘膜障害において、その発症機序に好中球侵潤が関与しているとの報告もある。

本発明におけるマンガ含有天然素材として使用される茶の添加意義については前述したとおりであるが、さらに茶葉成分がMPO活性を阻害するか否かを *in vitro* で検討した。

0. 1%過酸化水素および1.03mMのオージアニシジンを含む50mMリン酸バッファー (pH 5.4) 2.9mlに試験液50μlとMPO精製酵素 (1.24ユニット/ml) 50μlとを添加後、25℃キュベット内で培養を行い、 $\lambda = 450 \text{ nm}$ での吸光度変化を5分間測定した。ブランクとして50mMリン酸バッファー (pH 5.4) 50μlを使用した。

試験液は、緑茶を熱水抽出した茶抽出液と、この茶抽出液中のMn濃度を測定してそれと同濃度になるようにMnCl₂をAPT培地に添加した液とを使用し、各Mn濃度におけるMPO活性阻害率を調べた。その結果を図9に示した。

図9から、茶抽出液はMPO酵素活性を阻害し、その阻害活性はMn濃度が高いほど高くなることがわかる。また、同濃度でのMnCl₂添加液と比較しても高い阻害率を示している。これは、Mn以外の茶葉成分の関与が考えられる。

そこで、茶葉中に含まれているMn以外の成分もMPO活性阻害に関与しているか否かを調べた。すなわち、Mn以外の成分としてカテキンに着目し、その粗精製物を用いてMPO阻害活性を前記と同様にして調べた。その結果を図10に

示す。同図から、カテキンは濃度が $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ レベルから阻害効果を示すことがわかる。

以上のことから、茶葉成分によるMPO活性の阻害を確認すると共に、その活性阻害にはMnおよびカテキンが関与することが明らかになった。

5 実施例 1 (ヨーグルトタイプ)

滅菌した牛乳1リットルに対して、茶葉(粉末化緑茶)を4g添加した。この茶葉添加牛乳にラクトバチラス・プランタラムを接種し、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ の温度を保ちながら18時間醗酵させた。

1 0 常法に従って、乳酸菌スターターおよび茶葉の添加量、醗酵時間などの製造条件を調整することにより、以下のヨーグルト形態を作製することができた。

- a. 固形(静置ヨーグルト)
- b. (半)固形(攪拌ヨーグルト)
- c. 液状(ドリンクヨーグルト)

実施例 2 (乳酸菌飲料タイプ)

1 5 所定量の脱脂乳およびショ糖の混合液に茶葉(粉末化緑茶)を添加したのち、ラクトバチラス・プランタラムを接種し、 37°C の温度を保ちながら18時間醗酵させた。ついで、醗酵液を水で希釈し、安定剤、香料などを加えて、液状ヨーグルトタイプの乳酸菌飲料を得た。このものの組成を表1に示す。

実施例 3 (乳酸菌飲料タイプ)

2 0 所定量の脱脂乳およびショ糖の混合液に茶葉(粉末化緑茶)であるシングルセル化茶葉(シングルセル食品(株)製)を添加したのち、ラクトバチラス・プランタラムを接種し、 37°C の温度を保ちながら18時間醗酵させた。ついで、醗酵液を水およびオレンジ果汁で希釈し、安定剤、香料などを加えて、ジュースタイプの乳酸菌飲料を得た。このものの組成を表1に示す。

表 1

原料	実施例 2 (液状ヨーグルトタイプ) (重量%)	実施例 3 (ジュースタイプ) (重量%)
脱脂乳	40.0	5.0
シヨ糖	14.0	14.0
水	45.0	70.0
茶葉	0.4	0.4
果汁	0.0	10.0
その他 ¹⁾	0.6	0.6

1) 安定剤、香料など

実施例 4 (凍結乾燥タイプ)

5×10^{10} 相当の菌体 (ラクトバチラス・プランタラム) と 4 g の茶葉 (粉末化緑茶) とを混合し、乳糖およびブドウ糖を賦形剤として凍結乾燥し、錠剤タイプの凍結乾燥品を得た。このものはそのまま摂取するのに適していた。

実施例 5 (凍結乾燥タイプ)

5×10^8 相当の菌体 (ラクトバチラス・プランタラム) と 4 g の茶葉 (粉末化緑茶) とを混合し、乳糖およびブドウ糖を賦形剤として凍結乾燥し、錠剤タイプの凍結乾燥品を得た。このものを市販牛乳に添加し、室温で 12～24 時間醗酵させたところ、ヨーグルトを作製できた。従って、この凍結乾燥品は一般家庭でヨーグルトを作製するのに適している。

請 求 の 範 囲

1. マンガン含有天然素材を加えて、カタラーゼ活性を有する菌で醗酵させた醗酵製品からなる、消化管内を含む生体内での抗酸化作用を有する抗酸化食品。
- 5 2. 前記カタラーゼ活性を有する菌が、ラクトバチラス・プランタラムである請求項 1 記載の抗酸化食品。
3. 前記マンガン含有天然素材が茶葉である請求項 1 記載の抗酸化食品。
4. カタラーゼ活性を有する菌体と、マンガン含有天然素材とを含有する乾燥品からなる、消化管内を含む生体内での抗酸化作用を有する抗酸化食品。
- 1 0 5. カタラーゼ活性を有する菌体と、マンガン含有天然素材とを含有する、消化管内を含む生体内での抗酸化作用を有する抗酸化製剤。
6. マンガン含有天然素材を加えてカタラーゼ活性を有する菌で醗酵させた醗酵製品を生体内に摂取して、スーパーオキシドジスムターゼ様活性とカタラーゼ活性とを同時に発現させることを特徴とする、消化管内を含む生体内での抗酸化方法。

1 5

2 0

2 5

1/10

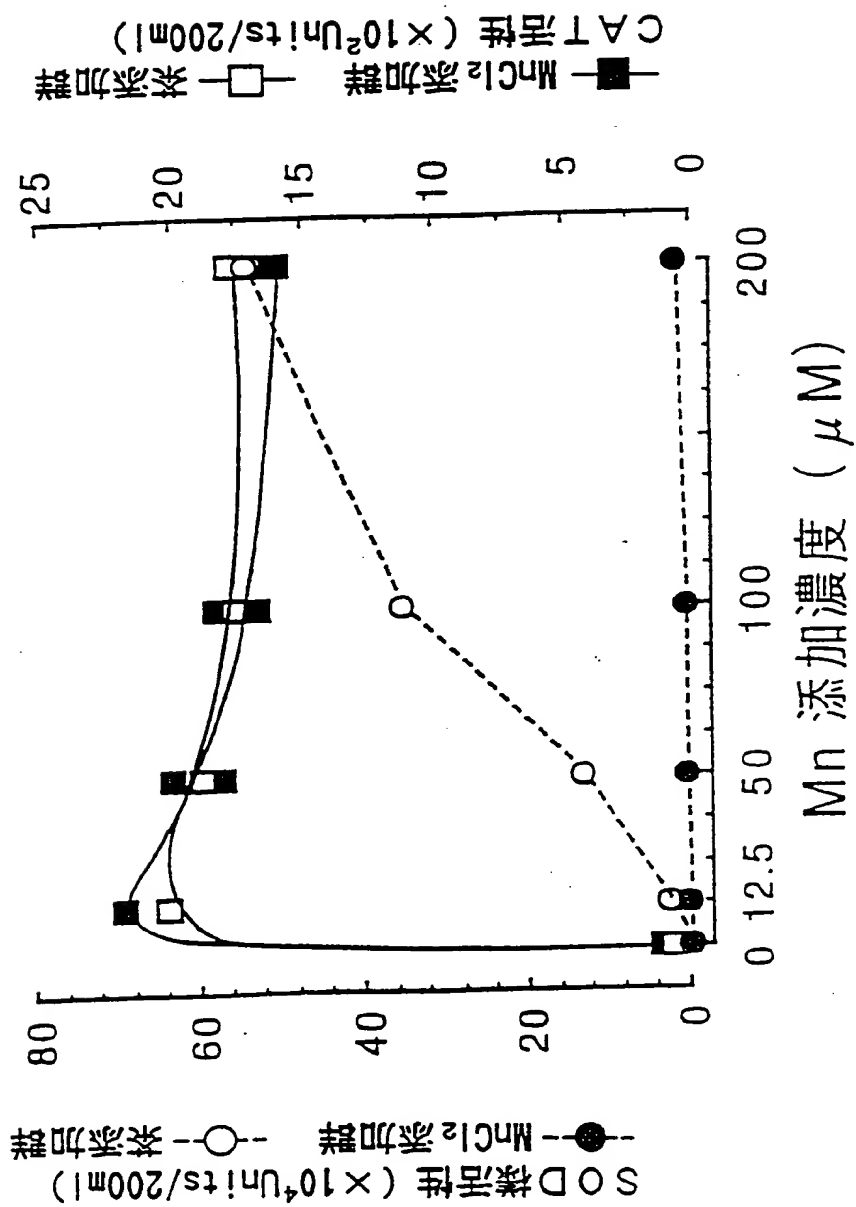
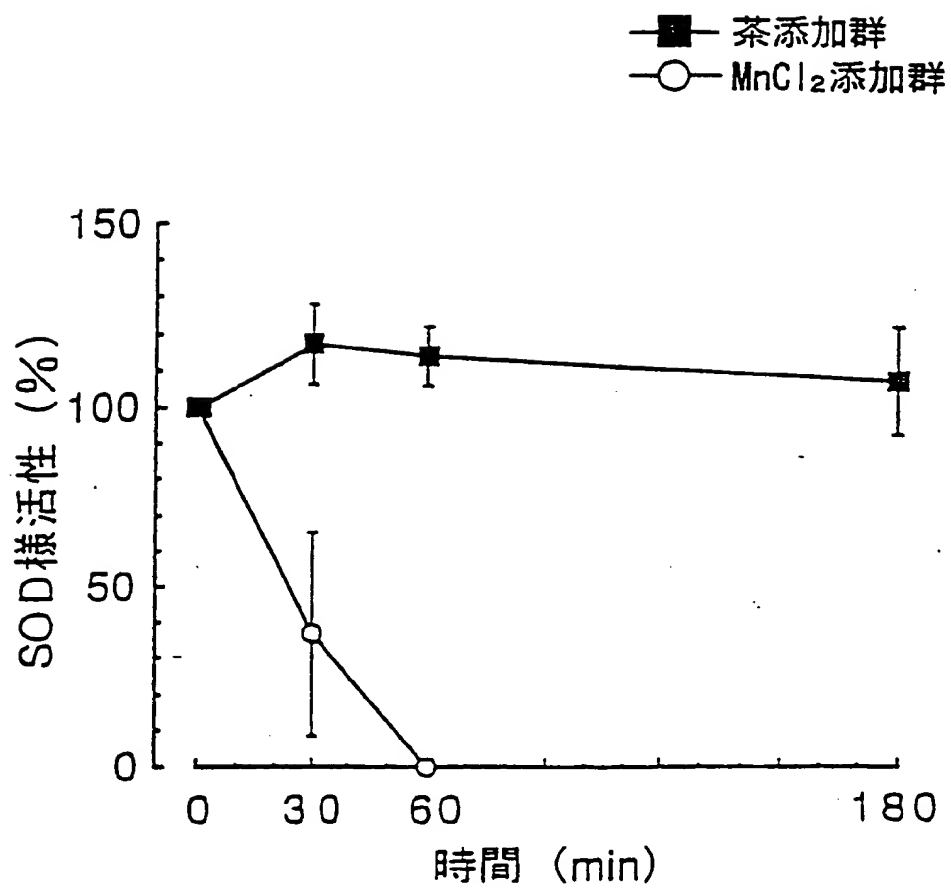


図1

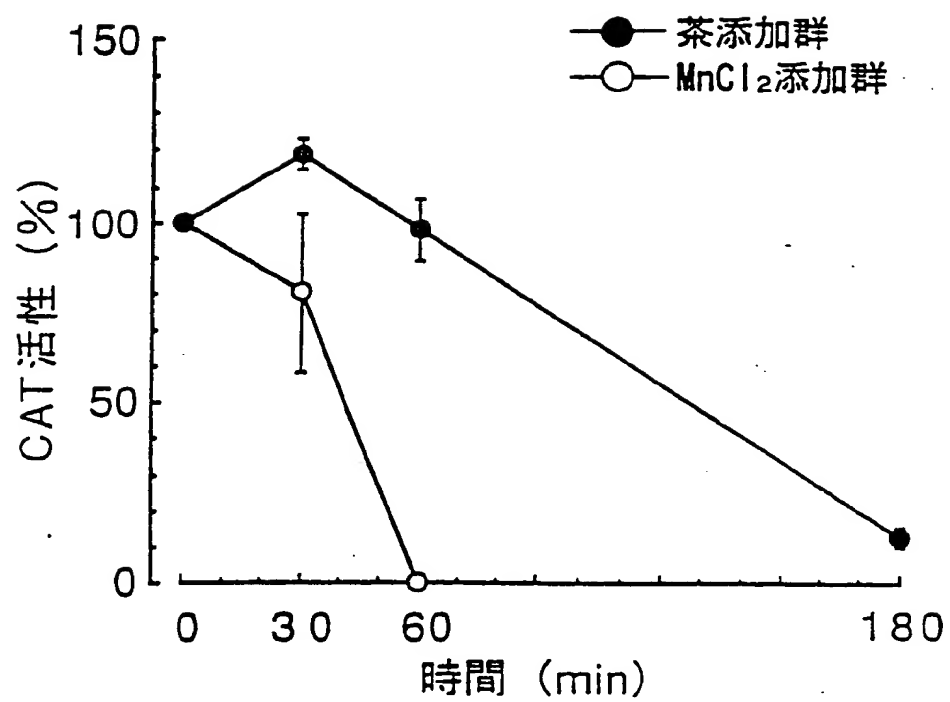
2/10

図 2



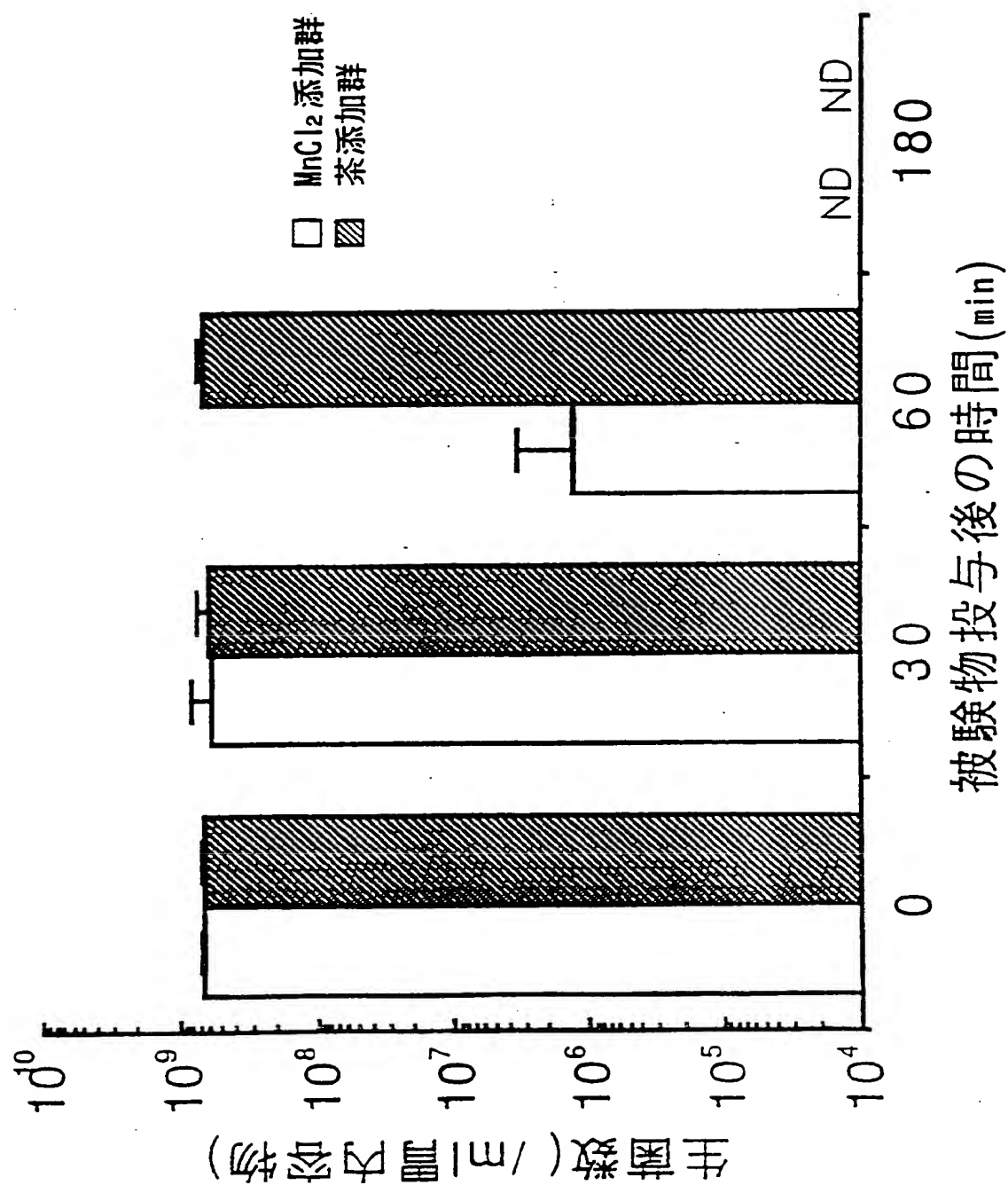
3/10

図 3



4/10

図4



5/10

図 5

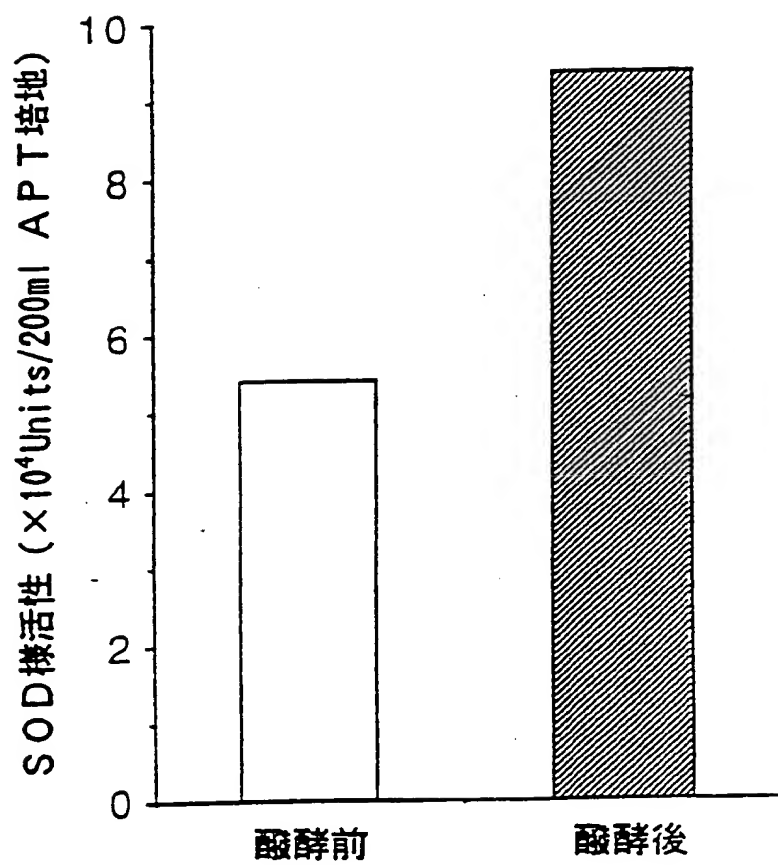
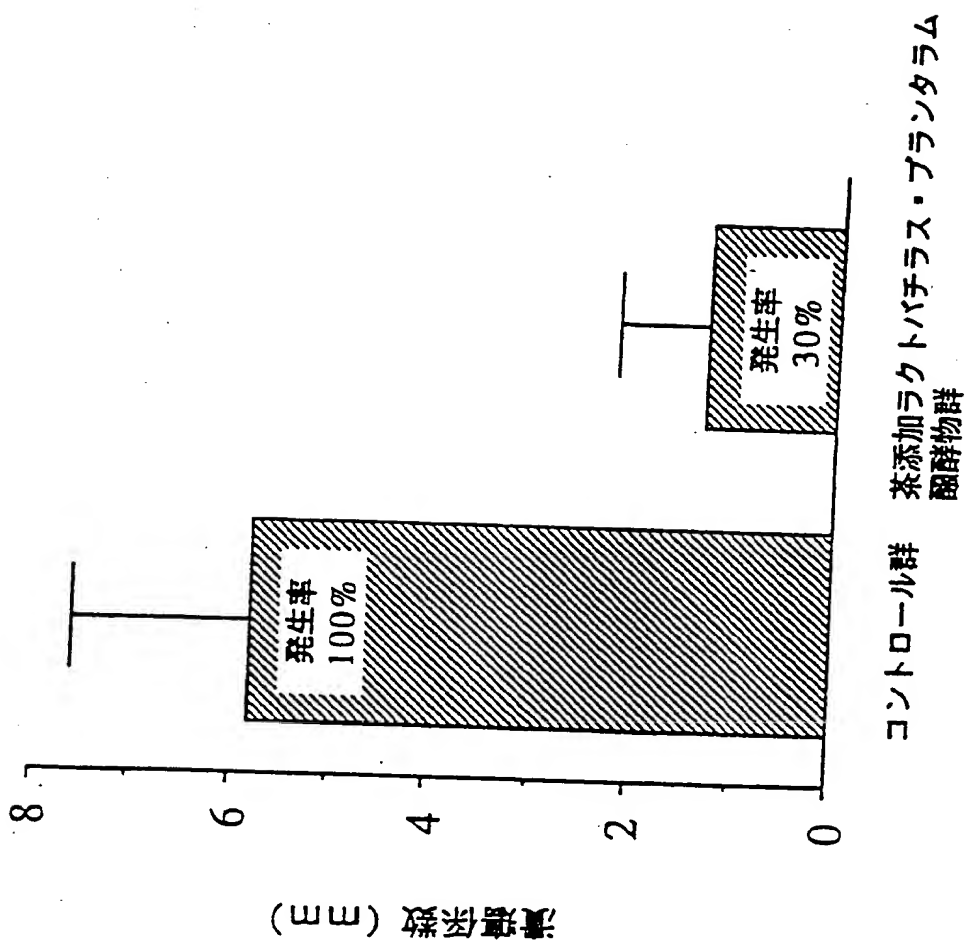
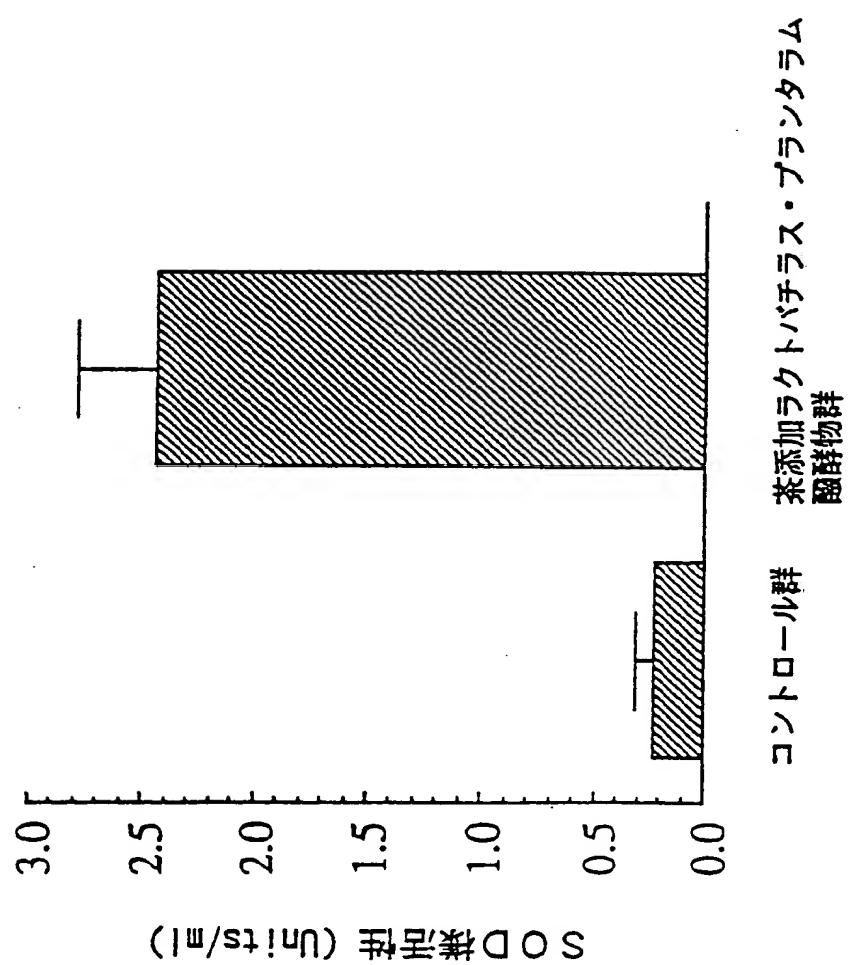


図6



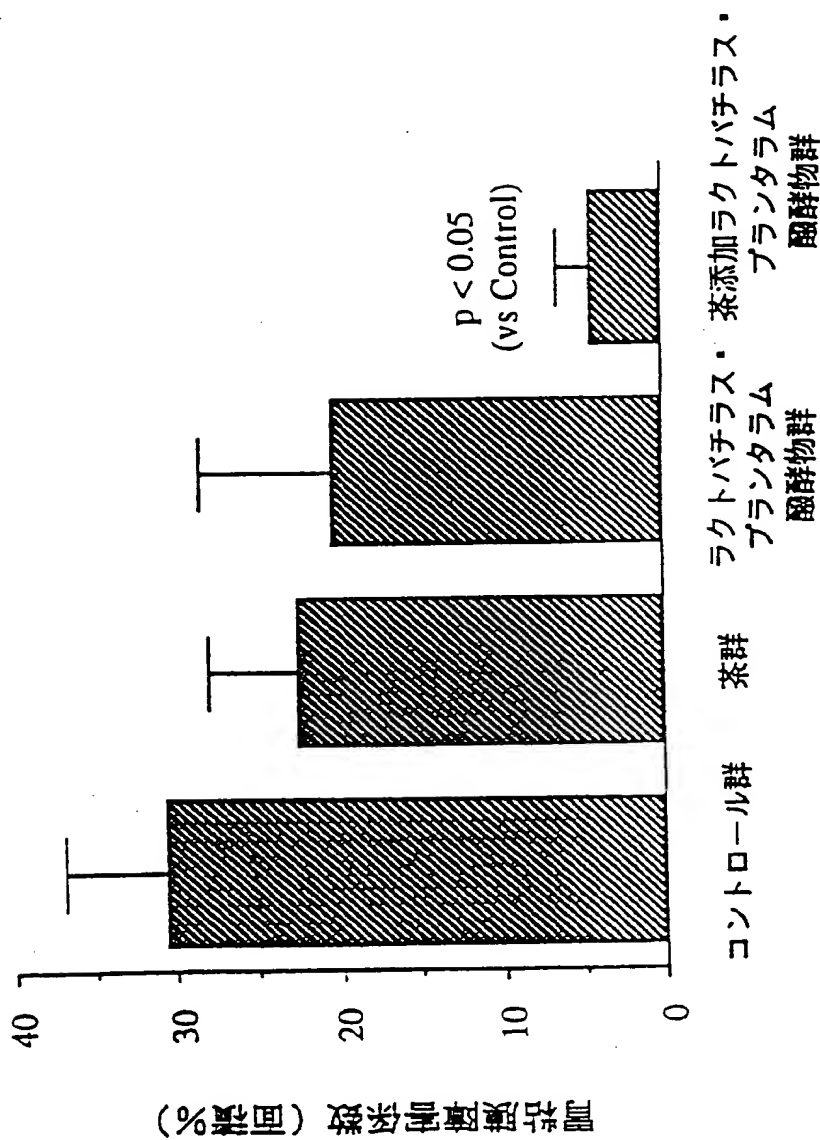
7/10

図7



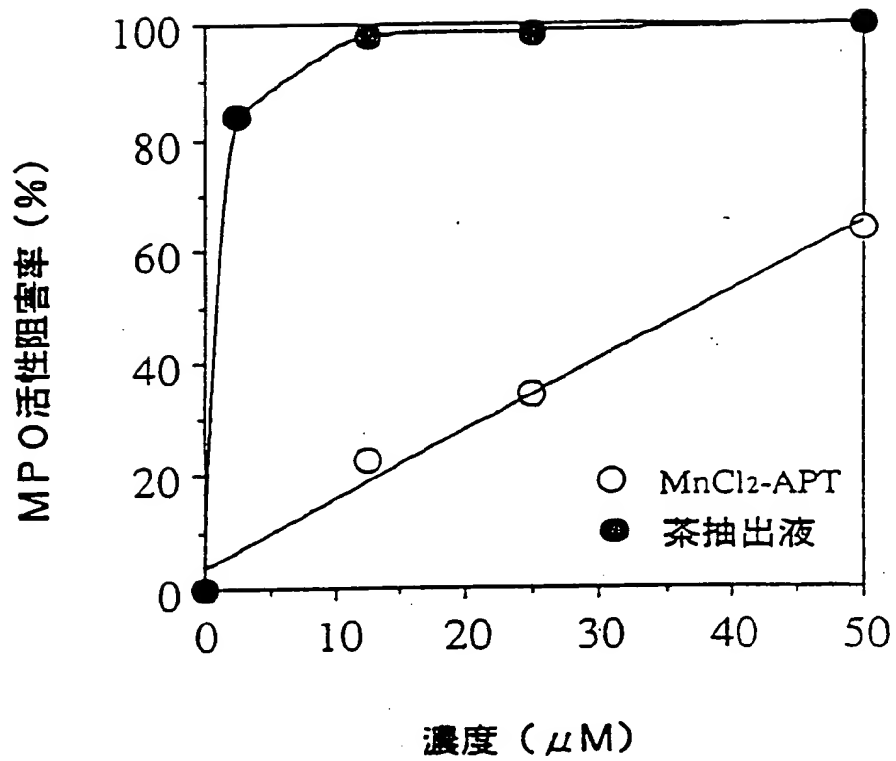
8/10

図 8



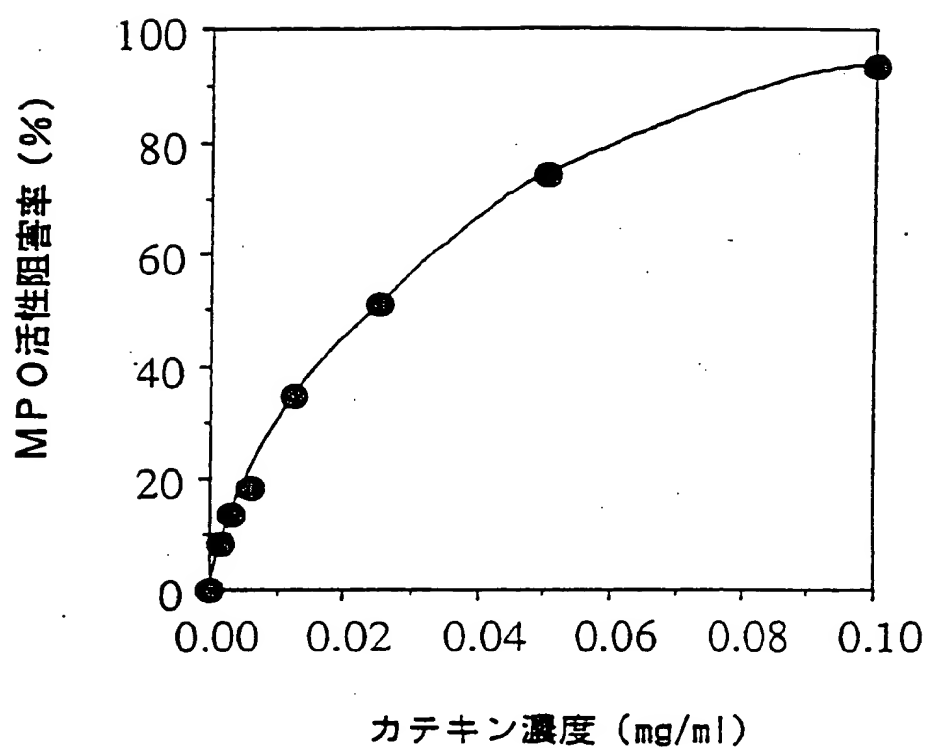
9/10

図 9



10/10

図10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A23L3/3472, 3571; A23C9/12-137; A23F3/30

According to International Patent Classification (IPC) r to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A23L3/3472, 3571, 358; A23C9/12-137; A23F3/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 2-3495 (Okuno Seiyaku Kogyo K.K.), January 9, 1990 (09. 01. 90), (Patent Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 28, 1994 (28. 07. 94)

Date of mailing of the international search report

August 16, 1994 (16. 08. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int. Cl.⁸ A 23 L 3 / 3 4 7 2 . 3 5 7 1 ; A 2 3 C 9 / 1 2 - 1 3 7 ; A 2 3 F 3 / 3 0</p>								
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int. Cl.⁸ A 23 L 3 / 3 4 7 2 . 3 5 7 1 . 3 5 8 ; A 2 3 C 9 / 1 2 - 1 3 7 ; A 2 3 F 3 / 3 0</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>								
<p>国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p>								
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width: 65%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width: 20%;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">JP, A, 2-3495 (奥野製菓工業株式会社), 9. 1月. 1990 (09. 01. 90), (パテントファミリーなし)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-6</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	A	JP, A, 2-3495 (奥野製菓工業株式会社), 9. 1月. 1990 (09. 01. 90), (パテントファミリーなし)	1-6
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号						
A	JP, A, 2-3495 (奥野製菓工業株式会社), 9. 1月. 1990 (09. 01. 90), (パテントファミリーなし)	1-6						
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 </div>								
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </div> </div>								
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">28. 07. 94</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">16.08.94</p>							
<p>名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p style="text-align: center;">郵便番号 100</p> <p style="text-align: center;">東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">伊 藤 明</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>							